

PLASMIDY PRO DEGRADACI XENOBIOTIK U GRAMPOZITIVNÍCH BAKTERIÍ

JAN KOŠTÁL a JARMILA PAZLAROVÁ

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6

Došlo dne 16.I.1998

Obsah

1. Úvod
2. Plasmidy rodu *Rhodococcus*
 - 2.1. Plasmid pRTL1
 - 2.2. Plasmidy pro metabolismus bifenyly
 - 2.3. Plasmid pBD2
 - 2.4. Plasmid pro utilizaci atrazinu
3. Plasmidy rodu *Arthrobacter*
 - 3.1. Plasmid pAO1
 - 3.2. Plasmid pro degradaci 2-hydroxypyridinu
4. Plasmidy rodu *Flavobacterium*
 - 4.1. Plasmid pOAD2
 - 4.2. Plasmidy pro degradaci parathionu
5. Plasmid rodu *Bacillus*
6. Závěr

1. Úvod

Tento přehledný článek volně navazuje na článek zabývající se obdobným tématem u gramnegativních bakterií¹. Většina plasmidů nalezených u grampozitivních bakterií nese genetické informace pro rezistenci vůči různým antibiotikům a podobným látkám². Biodegradační schopnosti grampozitivních bakterií nejsou podrobně známy tak, jako je tomu u gramnegativních bakterií. Přitom je stále více zřejmé, že například příslušníci rodu *Rhodococcus*³ disponují možná ještě větším spektrem biodegradačních schopností než všeobecně známý gramnegativní rod *Pseudomonas*.

Obecné vlastnosti biodegradačních plasmidů jsou zde obdobné jako u gramnegativních bakterií, k jejich hlavním charakteristikám tedy rovněž patří nezvyklá velikost, rela-

tivně nízká stabilita, možnost odláčení chemickými činidly (mitomycin C) nebo růstem při vysoké teplotě. Nejmarkantnějším rozdílem je častější výskyt lineárních plasmidů u grampozitivních bakterií. Lineární plasmidy kódují kromě biodegradačních a katabolických funkcí například produkci antibiotik ve streptomycetách⁴ a jiné, často velice exotické vlastnosti, jako je tvorba neštovic bakterií *Streptomyces azureus* nebo antigenní proměnlivost u *Borrelia hermsii*⁵. Lineární plasmidy se nemohou v buňce vyskytovat v CCC (kovalentně uzavřený kruh) formě a jsou proto mnohem „křehčí“ než kruhové, což významně ztěžuje jejich izolaci, pro kterou je potom často nutné použít stejné šetrných metod jako pro izolaci celých eukaryotických chromozomů⁶. K obtížnosti izolace plasmidů dále přispívá i to, že buněčná stěna grampozitivních bakterií je někdy odolnější k lýzi⁷. Tyto překážky mohou vysvětlovat zatím relativně malý počet biodegradačních plasmidů popsaných u grampozitivních bakterií.

V tabulce I jsou přehledně popsány biodegradační plasmidy.

2. Plasmidy rodu *Rhodococcus*

2.1. Plasmid pRTL1

Plasmid pRTL1 byl objeven u bakterie *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB13064 (cit. 8). Působením mitomycinu C ho lze odléčit s frekvencí $1,5 \cdot 10^{-3}$. Jeho velikost je přibližně 100 kb. Plasmid lze konjugačně přenášet do odláčeného kmene s vysokými frekvencemi (10^{-1} transkonjugantů na donor). Nese geny pro utilizaci kratších 1-chloralkanů (C₃ až C_g). Klíčovým enzymem je hydrolytická dehalogenasa, působením které vzniká z 1-chloralkanu odpovídající 1-alkohol. Plasmid pRTL1 má dvě další, méně obvyklé vlastnosti: může se integrovat do chromozomu a může dojít ke spontánní deleci fragmentu o délce 20 kb. Obě tyto změny jsou doprovázeny ztrátou schopnosti růstu na kratších chloralkanech a obě jsou reverzibilní. Autoři usoudili, že geny pro degradaci kratších 1-chloralkanů jsou umístěny na nějakém druhu mobilního elementu (transposonu), který se nachází na plasmidu pRTL1.

Tabulka I

Přehled degradačních plasmidů gram pozitivních bakterií

Mikroorganismus	Název plasmidu	Degradovaný substrát	Velikost [kb]	Poznámka	Lit.
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> NCIMB 13064	pRTL 1	1-chloralkany C3–C9	100		8
<i>Rhodococcus</i> RHA1	-	bifenylyl	1100	lineární	9
<i>R. erythropolis</i> TA421	-	bifenylyl		lineární	10
<i>R. erythropolis</i> BD2	pBD2	isopropylbenzen	210	lineární	2
<i>Rhodococcus</i> TE1	-	atrazin	77		12
<i>Arthrobacter oxidans</i>	pAO1	D,L-nikotin	160		13
<i>A. crystallopoietes</i>	-	2-hydroxypyridin	97		14,15
<i>Flavobacterium</i> KI72	pOAD2	6-aminokapronát	44		16
<i>Flavobacterium</i> sp. ATCC27551	pPDL2	parathion	39		17
<i>F. balustinum</i>	-	methylparathion	86		18
<i>Bacillus stearothermophilus</i> BR219	pGGO1	fenol	66		19

R. rhodochrous NCIMB 13064 roste také na 1-chloralkanech s delším řetězcem (C₁₀ až C₁₈). Tato vlastnost ale nemá spojitost s plasmidem pRTL1. Mechanismus biodegradace těchto delších chloralkanů je odlišný od výše popsaného mechanismu. Dochází zde k postupné oxidaci druhého konce haloalkanové molekuly za vzniku ω-chlorokyselin. V těchto buňkách byl také nalezen další plasmid, pRTL2, velký 80 kb. Jeho funkce však není známa.

2.2. Plasmidy pro metabolismus bifenyly

Pro vysokou nebezpečnost zamoření biosféry polychlorovanými bifenyly je studium biodegradace těchto látek a bifenyly v současné době velice populární. U kmene *Rhodococcus* sp. RHA1 byl popsán lineární megaplasmid o velikosti 1100 kb (cit.⁹). Produkty genů *bphACB* a *bphDEF* zajišťují oxidaci molekuly bifenyly přes katechol metabolickou dráhou, která je společná mnoha bakteriím (obr. 1). *Rhodococcus erythropolis* TA421 obsahuje velký, pravděpodobně lineární plasmid, který nese tři ze sedmi genů potřebných pro utilizaci bifenyly¹⁰.

2.3. Plasmid pBD2

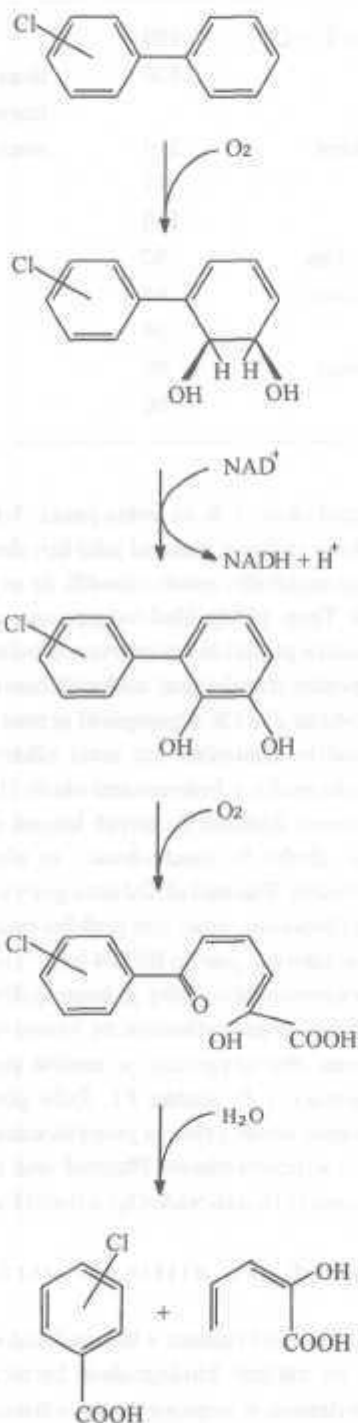
Plasmid pBD2 byl objeven u bakterie *Rhodococcus erythropolis* BD2, izolované na základě růstu na isopropylbenzenu jako jediném zdroji uhlíku a energie². Při kultivaci za neselektivních podmínek buňky plasmid spontánně ztrá-

cejí s frekvencí okolo 1 % za jednu pasáž. Jelikož selhaly všechny pokusy izolovat plasmid jako kovalentně uzavřenou kruhovou molekulu, autoři usoudili, že se jedná o lineární plasmid. Tento předpoklad byl potvrzen metodou pro izolaci lineárních plasmidů následovanou pulsní elektroforézou a štěpením restrikcími endonukleasami. Velikost pBD2 je přibližně 210 kb. Konjugační přenos tohoto plasmidu se podařilo uskutečnit jen mezi některými kmeny druhu *R. erythropolis*, s frekvencemi okolo 10⁻³ transkonjugantů na donor, zatímco do jiných kmenů rodu *Rhodococcus*, např. druhu *R. rhodochrous*, se plasmid pBD2 nepodařilo přenést. Plasmid pBD2 nese geny pro biodegradaci isopropylbenzenu, která zde probíhá stejnou metabolickou dráhou jako u *P. putida* RE204 (cit.¹¹) (viz cit.¹, obr. 5). Prvním enzymem této dráhy je isopropylbenzendioxygenasa, oxidující isopropylbenzen na 3-isopropylkatechol. Sekvence genu této oxygenasy je značně podobná genu toluendioxygenasy z *P. putida* F1. Dále plasmid pBD2 umožňuje svému nositeli růst na propylbenzenu, ethylbenzenu, toluenu a trichlorethenu. Plasmid také kóduje rezistenci proti arsenu (16 mM-NaAsO₂) a rtuti (3 μM-HgCl₂).

2.4. Plasmid pro utilizaci atrazinu

Tento plasmid byl nalezen v kmeni *Rhodococcus* TE1, izolovaném na základě biodegradace herbicidu derivátu 2-chlor-4-ethylamino-6-isopropylamino-*s*-triazinu (atrazin, obr. 2)¹². Fenotyp degradace atrazinu nebyl stabilní, po několika pasážích na neselektivním mediu ztratila jedna

čtvrtina buněk tento plasmid. Plasmid je velký 77 kb a byl pozorován jeho konjugační přenos do odloučených kmenů. Další vlastností spojenou s přítomností tohoto plasmidu v kmeni TE1 je schopnost degradovat jiný herbicid, *s*-



Obr. 1. Metabolismus bifenyly u bakterií

-ethyl-N,N-dipropylthiokarbamat (EPTC). Ačkoli atrazin a EPTC mají podobnou chemickou strukturu, není jisté, zda jejich degradace probíhá stejným mechanismem.

Na tomto plasmidu byly identifikovány geny *eptA* (degradace EPTC) a *atrA* (dealkylace atrazinu).

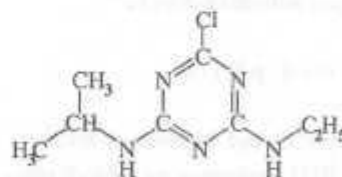
Atrazin nebyl mineralizován, byl pouze dealkylován na deethylatrazin (2-chlor-4-amino-6-isopropylamino-*s*-triazin, CIAT) a deisopropylatrazin (2-chlor-4-ethylamino-6-amino-*s*-triazin, CEAT). Atrazin nebyl ani využíván jako zdroj dusíku. *Rhodococcus* TE1 také metabolizoval jiné deriváty *s*-triazinu: propazin, simazin a cyanazin. Degradace atrazinu probíhala pravděpodobně nějakým oxidativním mechanismem, jelikož za nepřítomnosti kyslíku k žádné konverzi nedocházelo. Je zajímavé a u biodegradčních metabolismů méně obvyklé, že enzymy degradující atrazin jsou konstitutivního charakteru a tudíž nevyžadují indukci.

3. Plasmidy rodu *Arthrobacter*

3.1. Plasmid pAO 1

Bakterie *Arthrobacter oxidans* je schopna růstu na D,L-nikotinu (Nic^+ fenotyp) jako jediným zdroji uhlíku a dusíku¹³. Podrobnější experimenty odhalily, že tato vlastnost je v úzké spojitosti s přítomností velkého plasmidu, pAO1, v těchto buňkách. Nic^+ fenotyp ze spontánně ztrácel s frekvencí 6.10^{-4} , po působení akriflavinu s frekvencí 6.10^{-3} a po působení akridinové oranže s frekvencí 7.10^{-3} . Nejvyšší frekvence ztráty plasmidu (8.10^{-2}) byla pozorována při růstu buněk při 42 °C. Reverze takto vzniklých kolonií na původní Nic^+ fenotyp nebyla detegována. Plasmid pAO1 byl izolován a jeho velikost byla odhadnuta elektronovou mikroskopií na 160 kb.

Tento plasmid bylo možno konjugativně přenášet do jiných Nic^+ druhů rodu *Arthrobacter* (*A. oxidans*, *A. globiformis*, *A. albidus*, *A. simplex*) s frekvencemi 10^{-6} až 10^{-9} . V původním kmenu *A. oxidans* a v transkonjugantech byla nalezena aktivita 6-hydroxy-L-nikotinoxidasy, na rozdíl od Nic^+ kmenů. Uvedené experimenty tedy nedokazují přítom-



Obr. 2. Struktura atrazinu; 2-chlor-4-ethylamino-6-isopropylamino-*s*-triazinu

nost genů celé biodegradční dráhy pro nikotin na plasmidu pAO1, avšak dokazují plasmidový původ genu pro minimálně jeden enzym této dráhy, zmíněné 6-hydroxy-L-nikotinoxidasy.

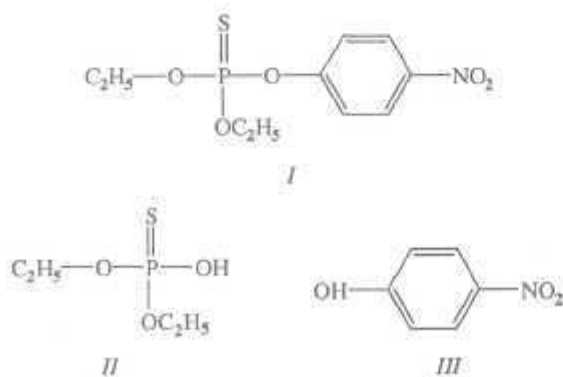
3.2. Plasmid pro degradaci 2-hydroxypyridinu

Arthrobacter crystallopoietes je schopen utilizace dusíkatého heterocyklu 2-hydroxypyridinu (2-HP), přičemž dochází k tvorbě extracelulárního pigmentu. Obě tyto vlastnosti jsou spojeny s přítomností plasmidu o velikosti 97 kb (cit. ^{14,15}). Tento plasmid kóduje jen některé enzymy metabolismu 2-HP, mezi nimiž je i NADH-dependentní monoxygenasa, která katalyzuje počáteční oxidaci molekuly 2-HP. Za neselektivních podmínek se plasmid spontánně ztrácí a frekvenci této ztráty lze zvýšit účinkem akridinové oranže nebo mitomycinu C.

4. Plasmidy rodu *Flavobacterium*

4.1. Plasmid pOAD2

Lineární dimer, cyklický dimer, vyšší oligomery 6-aminokapronové kyseliny a ϵ -kaprolaktam se dostávají do odpadních vod při průmyslové výrobě nylonu-6 a většina mikroorganismů není schopná jejich degradace. U kmene *Flavobacterium* sp. KI72 byl popsán plasmid pOAD2 o velikosti 44 kb, který nese strukturální geny enzymů účastnících se metabolismu cyklického dimery 6-aminokapronové kyseliny¹⁶. Tento plasmid lze standardními postupy odléčit, avšak konjugální přenos nebyl pozorován.



Obr. 3. Hydrolýza parathionu popsaná u bakterií rodu *Flavobacterium*; Chemická struktura parathionu (I) a produktů jeho hydrolýzy diethylthiofosforečné kyseliny (II) a paranitrofenolu (III)

4.2. Plasmidy pro degradaci parathionu

Parathion patří mezi hojně užívané širokospektré organofosfátové insekticidy. Po krátké době jeho užívání se v půdě začaly objevovat bakterie disponující parathionhydrolasou, které jsou schopny hydrolyzovat parathion na diethylthiofosforečnou kyselinu a paranitrofenol (PNP) (obr. 3), čímž se tato látka inaktivuje. U kmene *Flavobacterium* sp. ATCC 27551 byl popsán plasmid pPDL2 o velikosti 39 kb, na kterém je přítomen gen *opd*, kódující zmíněnou parathionhydrolasu¹⁷. Bylo zjištěno, že tento gen a přilehlé úseky jsou homologní s úsekem plasmidu pCS1 (cit. ¹), který plní stejnou funkci u gramnegativní bakterie *Pseudomonas diminuta*.

Buňky jednoho kmene druhu *Flavobacterium balustinum* obsahují 86 kb velký plasmid, kódující parathionhydrolasu, jejíž účinkem je methylparathion degradován na paranitrofenol¹⁸. Tento plasmid lze odléčit mitomycinem C.

5. Plasmid rodu *Bacillus*

U termofilní bakterie *Bacillus stearothermophilus* BR219 byl popsán 66 kb velký nízkokopiový plasmid pGGO1 (cit. ¹⁹), kódující enzymy potřebné pro oxidaci fenolu, která zde probíhá přes katechol a dále *meta* drahou (viz cit. ¹, obr. 3), stejně jako u většiny plasmidů gramnegativních bakterií. Na klonovaném úseku byly lokalizovány dva geny, *pheA* a *pheB*. Produkt genu *pheA* je pravděpodobně fenolhydroxylasa o molekulové hmotnosti 43 kDa vyžadující NADH jako kofaktor. Nukleotidová sekvence *pheA* se nepodobá ostatním popsáným bakteriálním fenolhydroxylasám, ale je velice podobná genu hydroxylasy *actV* ze *Streptomyces coelicolor*, jejíž funkcí je deaktivace antibiotik, a hydroxylasy s blíže neurčenou funkcí rodu *Rhodococcus*. Fenolhydroxylasa kmene BR219 je také schopna oxidovat kresoly, které působí rovněž jako induktoři syntézy tohoto enzymu.

6. Závěr

Díky novým nebo dostupnějším metodám, mezi které patří například pulsní elektroforéza nebo fúze bakteriálních protoplastů, prožívá v současnosti výzkum molekulární genetiky gram pozitivních bakterií rychlý vývoj. Podle pohledu na letopočty citovaných referencí lze u této skupiny

bakterií v nejbližších letech očekávat prudký nárůst počtu popsanych degradačních plasmidů, takže tento souhrnný článek bohužel rychle zastará; jeho význam je však zřejmý například z faktu, že je to vůbec první souhrnný článek svého druhu (pokud je autorům známo), a to nejen v českém jazyce.

LITERATURA

1. Košťál J., Demnerová K.: Chem. Listy 93, 128 (1998).
2. Dabrock B., Kessler M., Averhoff B., Gottschalk G.: Appl. Environ. Microbiol. 60, 853 (1994).
3. Finnerty W. R.: Annu. Rev. Microbiol. 46, 193 (1992).
4. Kinashi H., Shimaji M., Sakai A.: Nature, London 328, 454 (1987).
5. Plasterk R. H., Simon M. I., Barbour A. G.: Nature, London 318, 257 (1985).
6. Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. A., Smith J. A., Struhl K.: *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates, New York 1987.
7. Gerhard P., Murray R. G. E.: *Methods for General and Molecular Bacteriology* (Wood A., Krieg R., ed.). American Society for Microbiology, Washington 1994.
8. Kulakova A. N., Stafford T. M., Larkin M. J., Kulakov L. A.: Plasmid 33, 208 (1995).
9. Masai E., Sugiyama K., Iwashita N., Shimizu S., Hauschild J. E., Hata T., Kimbara K., Yano K., Fukuda M.: Gene 187, 141 (1997).
10. Kosono S., Maeda M., Fuji F., Arai H., Kudo T.: Appl. Environ. Microbiol. 63, 3282 (1997).
11. Eaton R. W., Timmis K. N.: J. Bacteriol. 168, 123 (1986).
12. Behki R., Topp E., Dick W., Germon P.: Appl. Environ. Microbiol. 59, 1955 (1993).
13. Brandsch R., Hinkkanen A. E., Decker K.: Arch. Microbiol. 732, 26 (1982).
14. Kolenbrander P. E., Weinberger M.: J. Bacteriol. 732, 51 (1977).
15. Weinberger M., Kolenbrander P. E.: Can. J. Microbiol. 25, 329 (1979).
16. Negoro S., Shinagawa H., Nakata A., Kinoshita S., Hatozaki T., Okada H.: J. Bacteriol. 743, 238 (1980).
17. Mulbry W. W., Kearney P. C., Nelson J. O., Karns J. S.: Plasmid 18, 173 (1987).
18. Somara S., Siddavattam D.: Biochem. Mol. Biol. Int. 36, 627 (1995).
19. Kim I. C., Oriel P. J.: Appl. Environ. Microbiol. 61, 1252 (1995).

J. Košťál and J. Pazlarová (*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Plasmids in Degradation of Xenobiotics in Gram-positive Bacteria**

The review surveys biodegradative plasmids that were found in Gram-positive bacteria. The metabolic pathways encoded by these plasmids are briefly described. Plasmid properties are compared with those of plasmids of Gram-negative bacteria. Included is also a comprehensive table listing all described plasmids along with some of their properties.